

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de physiologie
Département de biologie animale,
anatomie et physiologie comparées

FACULTE DES SCIENCES
Professeur J. POSTERNAK
Professeur H. J. HUGGEL

ETUDE DES PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES
DES CELLULES PIGMENTAIRES
DE LA RETINE DU FAUX-BOURDON
(*Apis mellifera*)

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Daniel BERTRAND

de

Genève

Texte condensé de la thèse No 1650, approuvée par la Faculté des sciences. Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève. Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse No 1650

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène

1974

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de physiologie
Département de biologie animale,
anatomie et physiologie comparées

FACULTE DES SCIENCES
Professeur J. POSTERNAK
Professeur H. J. HUGGEL

**ETUDE DES PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES
DES CELLULES PIGMENTAIRES
DE LA RETINE DU FAUX-BOURDON
(Apis mellifera)**

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Daniel BERTRAND

de

Genève

Texte condensé de la thèse No 1650, approuvée par la Faculté des sciences. Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève. Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse No 1650

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

La Faculté des sciences, sur le préavis du professeur F. Baumann, directeur scientifique, du professeur H. Huggel, responsable devant la Faculté et du professeur assistant A. Perrelet (Faculté de médecine — Genève), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 8 mai 1974

Le doyen :
Jean Muller

Thèse No 1650



L'étude de la structure fine de l'oeil du faux-bourdon (*Apis mellifera* L.) a montré que cet oeil est composé d'environ huit mille unités visuelles ou ommatidies (PERRELET 1970). Chaque ommatidie, formée elle-même de 9 cellules rétinien- niennes, possède son propre système dioptrique, sensoriel et nerveux. Les ommatidies mesurent environ 400 microns de longueur et ont une forme légèrement cônica; leur plus grand diamètre est d'environ 30 microns. L'appareil dioptrique de chaque ommatidie est formé par une des facettes hexagonales de la cornée et par les quatres cellules du cristallin. Il concentre les rayons lumineux sur le rhabdome qui constitue la partie photosensible de l'ommatidie. Le rhabdome est composé par des microvillosités provenant des cellules rétinien- nes. Des 9 cellules rétinien- nes formant une ommatidie, 6 sont grandes et 3 sont plus petites. Les microvillosités des grandes cellules rétinien- nes forment la presque totalité du rhabdome; les petites cellules n'y contribuent que par quelques microvillosités. Une gaine de cellules pigmentaires entourant les cellules rétinien- nes s'étend de la cornée à la membrane basale. La membrane basale est traversée par les axones des cellules rétinien- nes qui forment ensuite des synapses dans la lamina ou plus centralement. La figure 1 montre une représentation schématique d'une ommatidie. A proximité du cristallin, les cellules pigmentaires qui séparent les cellules rétinien- nes de deux ommatidies voisines sont riches en glycogène et en grains de pigment accessoire; les cellules rétinien- nes sont, elles, particulièrement riches en mitochondries. A ce niveau distal, les cellules pigmentaires ont leurs dimensions maximales, environ 5 micromètres de largeur et 2 micromètres d'épaisseur. Elles s'amincissent progressivement en direction de la membrane basale.

Les cellules rétinienne et pigmentaires sont séparées par un espace extracellulaire d'une largeur de 150 à 200 Å environ, pouvant être comparé à celui existant entre les neurones et les cellules gliales du système nerveux.

Il a été montré par marquage à l'aide du lanthane, de la peroxidase ou de la ferritine, que cet espace extracellulaire est librement accessible au liquide de perfusion.

Dans leurs travaux sur la rétine du faux-bourdon, NAKA et EGUCHI (1962) ont montré que des potentiels récepteurs peuvent être enregistrés intracellulairement en réponse à des stimuli lumineux. Ces potentiels récepteurs sont attribués aux cellules rétinienne (BERTRAND et PERRELET, 1969) et sont principalement liés à une augmentation de la perméabilité de ces cellules aux ions sodium (FULPIUS et BAUMANN, 1969).

Le but de ce travail est d'étudier les propriétés électrophysiologiques des cellules pigmentaires, ainsi que les caractéristiques des dépolarisations transitoires lentes enregistrées dans ces cellules lors de stimulations lumineuses de courte durée de la rétine. Une comparaison de ces réponses avec celles des cellules rétinienne est présente dans la figure 2. Lorsqu'une microélectrode est introduite dans une cellule pigmentaire, une déflexion négative stable du potentiel est observée. Cette variation du potentiel constitue le potentiel de repos des cellules pigmentaires; pour une population de plus de 50 cellules sa valeur était en moyenne de $-45,7 \text{ mV} \pm 3 \text{ mV}$.

La mesure du potentiel de repos des cellules pigmentaires dans différentes concentrations ioniques du milieu de perfusion (Tableau I) a montré que celui-ci dépend essentiellement du gradient potassique entre l'extérieur et l'intérieur

des cellules pigmentaires et faiblement du gradient sodique. La figure 3 représente le potentiel de repos des cellules pigmentaires en fonction du logarithme de la concentration externe de potassium. La relation entre le potentiel de membrane des cellules pigmentaires et le logarithme de la concentration extracellulaire de potassium devient linéaire pour des concentrations de potassium externe supérieures à 12 mM.

Les modifications du potentiel de membrane des cellules pigmentaires observées lors de changements de la concentration extracellulaire de chlore indiquent que ces cellules sont également perméables à cet anion. Cependant, contrairement aux variations du potentiel de membrane qui sont produites par des changements de la concentration de sodium ou de potassium, celles qui sont dues au chlore sont transitoires : après la dépolarisation observée lors d'une diminution de la concentration de chlore, ou l'hyperpolarisation constatée lors d'une augmentation de celle-ci, le potentiel des cellules pigmentaires retourne toujours à sa valeur originale et ceci malgré le maintien de la concentration donnée de chlore. Cette observation permet de conclure que les ions chlore sont distribués passivement entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule pigmentaire, selon le potentiel de membrane, et que le chlore contrairement au sodium et surtout au potassium, ne participe pas à l'établissement du potentiel de membrane des cellules pigmentaires au repos.

Lors de l'illumination de la rétine par des flashes de courte durée (10 à 100 msec environ), des dépolarisations transitoires lentes des cellules pigmentaires sont enregistrées. L'amplitude et le déroulement temporel de ces réponses dépendent de la durée et de l'intensité de la stimulation. La réponse des cellules pigmentaires évoquée par un stimulus intense de 20 msec de durée peut atteindre 40 mV. et durer 4 sec environ.

La figure 4 représente la réponse d'une cellule pigmentaire évoquée par une stimulation intense de la rétine par un flash d'une durée de 20 msec.

La cause la plus probable des dépolarisations des cellules pigmentaires évoquées par une stimulation lumineuse de la rétine est une augmentation transitoire de la concentration de potassium dans l'espace extracellulaire situé entre ces cellules et les cellules rétinienne. Les cellules rétinienne constituent probablement la source du potassium libéré durant le potentiel récepteur.

Les données en faveur de cette hypothèse sont :

- a) La similitude des modifications de la réponse de la cellule pigmentaire et de la cellule rétinienne à une illumination de la rétine observée lorsque les conditions expérimentales sont changées (par exemple, la réduction de l'amplitude des réponses de ces deux cellules lorsque la concentration de sodium de la solution de perfusion est diminuée).
- b) L'absence d'influence d'une dépolarisation ou d'une hyperpolarisation des cellules pigmentaires sur la forme et l'amplitude de leurs réponses.
- c) La diminution d'amplitude de la réponse des cellules pigmentaires qui est observée lorsque la concentration de potassium de la solution de perfusion est augmentée.

L'absence d'effet de courant polarisant sur les réponses des cellules pigmentaires (Fig. 5) indique que la perméabilité membranaire de ces cellules ne change pas pendant l'illumination de la rétine. Les réponses des cellules pigmentaires à la lumière ne peuvent par conséquent pas être attribuées à un influx ionique mais doivent résulter d'une modification d'un gradient ionique à travers la membrane de la cellule

pigmentaire. Ces expériences indiquent également que les cellules rétiniennes et les cellules pigmentaires ne sont pas couplées électriquement et que la réponse de la cellule pigmentaire ne peut pas être la conséquence d'un envahissement passif de cette cellule par le potentiel récepteur de la cellule rétinienne.

La réduction d'amplitude des réponses des cellules pigmentaires observées lorsque la concentration de potassium de la solution de perfusion est augmentée correspond à celle qui est prévisible lorsque l'on tient compte de la relation logarithmique existant entre le potentiel de repos des cellules pigmentaires et la concentration externe de potassium (Fig. 6). Cette concordance entre les résultats théoriques et expérimentaux est un bon argument en faveur de notre hypothèse, selon laquelle les réponses des cellules pigmentaires proviendraient d'une augmentation transitoire de la concentration de l'espace extracellulaire. Une interprétation identique des réponses des cellules gliales dans le nerf optique du Necturus à une stimulation électrique de ce nerf a été donnée par ORKAND et coll. (1966).

Un modèle mathématique tenant compte de l'efflux de potassium des cellules rétiniennes et de la diffusion libre de ces ions dans l'espace extracellulaire, a été réalisé. Ce modèle a permis de montrer que la phase initiale des réponses des cellules pigmentaires peut effectivement être expliquée à partir de l'augmentation de la concentration de potassium dans l'espace extracellulaire à condition que l'efflux de potassium soit proportionnel à l'intensité et à la durée du stimulus lumineux et que la diffusion dans l'espace extracellulaire soit libre. L'hypothèse que l'efflux de potassium dépend linéairement de l'intensité de stimulation peut être admise comme correcte. En effet, la relation observée

entre le logarithme de l'intensité de stimulation et l'amplitude des réponses pigmentaires est linéaire, ce qui indique qu'il doit exister également une relation linéaire entre l'efflux de potassium des cellules rétinienne et l'intensité de stimulation. La diffusion des ions potassium dans l'espace extracellulaire peut aussi être admise comme libre puisque les dimensions des molécules hydratées de potassium ($3,96 \text{ \AA}$) sont beaucoup plus petites que celles du canal extracellulaire existant entre les cellules rétinienne et les cellules pigmentaires ($200 \text{ \AA}$). Dans ce modèle, la concentration de potassium se trouvant au voisinage des membranes des cellules pigmentaires en fonction du temps ne dépend donc que de la géométrie du système et de l'efflux de potassium des cellules rétinienne. Par conséquent, les réponses des cellules pigmentaires à des stimuli d'intensité différente ne doivent différer en amplitude que d'un facteur multiplicatif, lui-même proportionnel au logarithme de l'intensité de stimulation. L'analyse des propriétés de ce modèle indique également qu'une modification de la durée des stimuli doit influencer la forme et l'amplitude des réponses des cellules pigmentaires.

La comparaison des courbes théoriques avec les réponses pigmentaires enregistrées soit pour des stimulations d'intensité variable, soit pour des stimulations de durée différente, montre effectivement que ce modèle est compatible avec les résultats expérimentaux.

L'ensemble de ces observations permet donc de conclure que les réponses des cellules pigmentaires à l'illumination de la rétine sont probablement dues à une augmentation de la concentration de potassium dans l'espace extracellulaire et que cette augmentation provient de l'efflux de potassium des cellules rétinienne durant le potentiel récepteur. Cette

conclusion trouve une confirmation dans des expériences récentes de HOLT et BROWN (1972) montrant à l'aide de marquage radioactif que l'illumination des cellules photoréceptrices de l'oeil ventral du Limule est accompagnée par une augmentation de l'efflux potassique de ces cellules. Le rôle traditionnel attribué jusqu'à maintenant aux cellules pigmentaires des rétines d'insectes était celui de l'isolation optique des ommatidies formant l'oeil composé. En effet, l'absence de cellules pigmentaires autour des cellules rétinienne pourrait avoir pour conséquence qu'une partie de la lumière traversant l'appareil dioptrique et le rhabdome d'une ommatidie puisse diffuser latéralement dans les ommatidies voisines et y produire une excitation des cellules rétinienne. L'excitation d'ommatidies qui ne sont pas illuminées directement causerait une réduction du pouvoir de résolution spatial de l'oeil. Cependant, en considérant le fait, mis en évidence dans ce travail, que les cellules rétinienne libèrent du potassium pendant le potentiel récepteur, on peut se demander si les cellules pigmentaires n'ont pas en plus de leur fonction d'isolation optique, une fonction d'isolation ionique. En effet, la présence d'une gaine de cellules pigmentaires autour de chaque cellule rétinienne empêche probablement que le potassium libéré par cette cellule pendant le potentiel récepteur ne puisse dépolariser des cellules rétinienne non illuminées appartenant à des ommatidies voisines. Une telle interaction ionique entre deux ommatidies, comme dans le cas d'une diffusion latérale de la lumière, aurait un effet défavorable sur le pouvoir de résolution spatial de l'oeil. Une gaine de cellules pigmentaires empêchant ou limitant la fuite de potassium dans les espaces extracellulaires éloignés de l'ommatidie stimulée pourrait également prévenir un appauvrissement progressif de la

cellule rétinienne en potassium. Pendant le potentiel récepteur, le potassium libéré reste probablement au voisinage immédiat de la cellule rétinienne dans le mince espace extracellulaire délimité par les cellules pigmentaires et peut y être facilement repris par la pompe membranaire des cellules rétiniennes à la fin de l'illumination.

On peut enfin considérer un rôle éventuel des cellules pigmentaires comme réservoir énergétique. Des expériences préliminaires ont montré que la stimulation prolongée (120 min) de la rétine avec une lumière intense provoque une diminution significative de la concentration du glycogène rétinien. Comme le glycogène est contenu essentiellement dans les cellules pigmentaires, il est possible de supposer que l'illumination, via l'augmentation du potassium extracellulaire, soit le signal déclanchant la glycogénolyse dans les cellules pigmentaires et que celle-ci assure un approvisionnement constant des cellules rétiniennes en glucose.

En conclusion, plusieurs fonctions possibles des cellules pigmentaires dans l'oeil du faux-bourdon semblent résider dans le fait que ces cellules délimitent un mince espace extracellulaire autour des cellules rétiniennes, espace qui pourrait limiter la vitesse des échanges ioniques entre le milieu immédiatement en contact avec les cellules rétiniennes et des milieux extracellulaires éloignés.

BIBLIOGRAPHIE

Bertrand D. et Perrelet A. : Localisation par coloration intracellulaire de divers types de réponse à la lumière dans l'oeil du faux-bourdon. J. Physiologie (Paris) 62, suppl. 1, 126-127 (1970).

Fulpius B. and Baumann F. : Effects of sodium, potassium and calcium ions on slow and spike potentials in single photoreceptor cells. J. Gen. Physiol. 53, 541-561 (1969).

Holt C.E. and Brown J.E. : Ions fluxes in photoreception in Limulus polyphemus ventral eye. Biochim. Biophys. Acta 274, 140-157 (1972).

Naka K. and Eguchi E. : Spike potentials recorded from the insect photoreceptor. J. Gen. Physiol. 45, 663-680 (1962).

Orkand R.K. Nicholls J.G. and Kuffler S.W. : The effect of nerve impulses on the membrane potential of the glial cells in the central nervous system of amphibia. J. Neurophysiol. 29, 788-806 (1966).

Perrelet A. : The fine structure of the retina of the honeybee drone. Z. Zellforsch. 108, 530-562 (1970).

TABLEAU No 1.

COMPOSITION DES SOLUTIONS

Solution	K ⁺	Na ⁺	TrisH ⁺	Ca ⁺⁺	Cl ⁻	Isaethionate de Na	Glucose
normale	3,2	280	-	1,8	286,8	-	11
10 x K ⁺ hypertonique	32	280	-	1,8	315,6	-	11
20 x K ⁺ hypertonique	64	280	-	1,8	346,6	-	11
sans Na ⁺	3,2	-	280	1,8	286,8	-	11
10 x K ⁺ sans Na ⁺	32	-	248	1,8	283,6	-	11
20 x K ⁺ sans Na ⁺	64	-	216	1,8	283,6	-	11
sans Cl ⁻	3,2	-	-	1,8	3,6	280	11

Toutes ces valeurs sont exprimées en mM.

Le pH de la solution était maintenu constant par une solution de tampon Tris HCl à 9 mM ou, lorsque la solution était oxygénée avec un mélange d'oxycarbonate à 5%, par une concentration de 3 mM de bicarbonate de sodium.

Fig. 1

Représentations schématiques d'une ommatidie de la rétine du faux-bourdon.

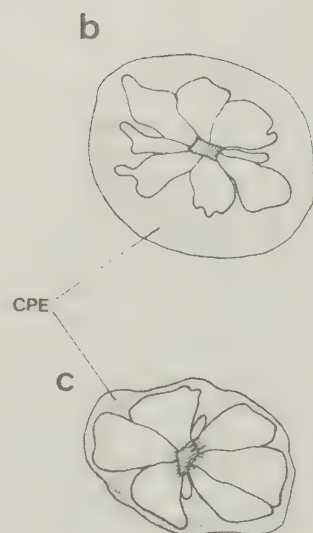
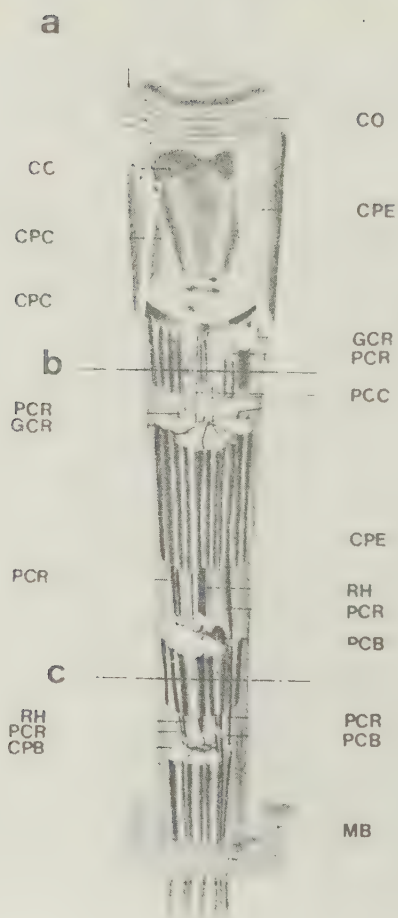
a) Vue longitudinale :

Pour donner plus de clarté au dessin, les proportions réelles de l'ommatidie (environ 400 μ de hauteur et 20 μ de largeur) ont été réduites à 1 : 3,5 dans le sens de la hauteur.

De haut en bas du dessin, on reconnaît successivement la cornée (CO) qui a la forme d'un hexagone à surface bombée (facette), formé de lamelles chitineuses. Au-dessous de la cornée, on voit le cône cristallin (CC) constitué de quatre cellules riches en glycogène et entouré de deux cellules pigmentaires cristalliniennes (CPC). Appliquées à la base des cellules pigmentaires cristalliniennes, apparaissent les cellules rétiniennes formant l'ommatidie. A ce niveau, ces cellules ont une forme irrégulière et sont au nombre de 8 : 6 grandes (GCR) et 2 petites (PCR). Au centre de l'ommatidie, les cellules visuelles ont des microvillosités qui forment le rhabdome. Celui-ci apparaît comme un parallélogramme finement strié aux angles duquel on voit les quatre prolongements du cône cristallin (PCC). Dans son tiers inférieur l'ommatidie est formée de 9 cellules à contour régulier la 9ème cellule est la petite cellule basale (PCB) qui est située entre deux grandes cellules rétiniennes et participe à la formation du rhabdome (rh) par quelques microvillosités. Les deux autres petites cellules (PCR) apparaissent à ce niveau sous forme d'axones. Près de la membrane basale (MB), qui sépare la rétine sensorielle du lobe optique, le rhabdome (rh) s'amincit et disparaît. Il est remplacé, au centre de l'ommatidie, par une cellule pigmentaire basale (CPB). Les 9 cellules de l'ommatidie (GCR, PCR, et PCB) apparaissent alors sous forme d'axones. Les cellules visuelles formant l'ommatidie sont étroitement entourées par les cellules pigmentaires externes (CPE) qui s'étendent de la cornée à la membrane basale.

b,c) Vues transversales :

Ces schémas représentent les proportions vraies des cellules pigmentaires (gris) par rapport aux cellules rétiniennes (blanc) à un niveau distal (b) et à un niveau proximal (c) de l'ommatidie.



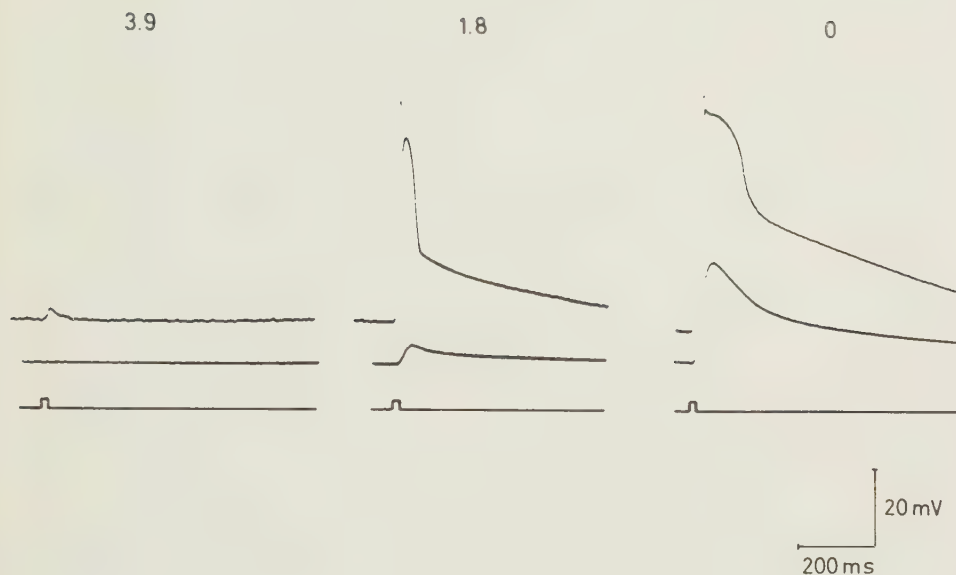


Fig. 2

Réponses d'une cellule rétinienne (tracé supérieur) et d'une cellule pigmentaire (tracé intermédiaire) à des stimuli durant 20 msec. mais à trois intensités différentes. Les chiffres situés en-dessus des tracés expriment, en unités logarithmiques, l'atténuation d'intensité du stimulus lumineux. Le moment et la durée d'ouverture de l'obturateur sont représentés sur le tracé inférieur.

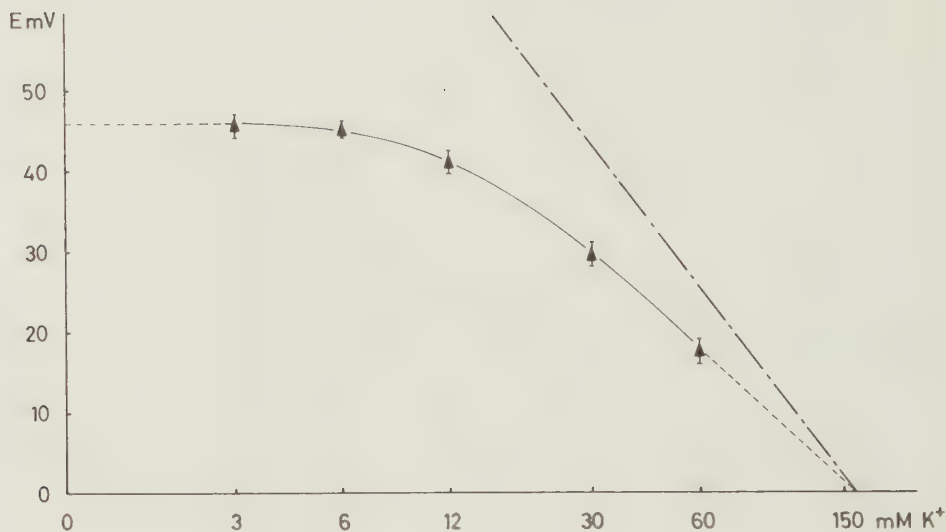


Fig. 3

Représentation du potentiel de repos des cellules pigmentaires en fonction du logarithme de la concentration externe de potassium, dans un milieu sodique normal.

Cette figure montre la différence existant entre la relation : concentration de potassium - potentiel, pour une membrane uniquement perméable aux ions K^+ (---) et la relation trouvée pour les cellules pigmentaires (▲-▲-). Chaque point représente une valeur moyenne obtenue sur 25 enregistrements intracellulaires (au minimum).

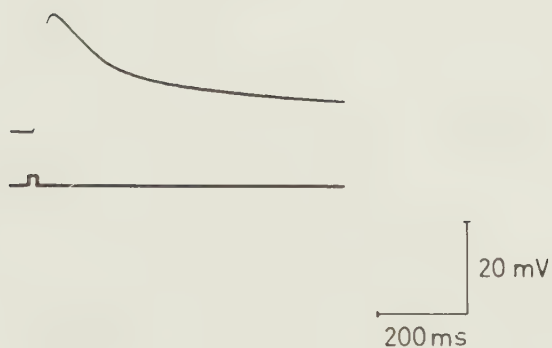


Fig. 4

Réponse d'une cellule pigmentaire (tracé supérieur) à une stimulation de la rétine par un flash intense d'une durée de 20 msec. Le moment et la durée d'ouverture de l'obturateur sont représentés sur le tracé inférieur.



Fig. 5

Effets d'un courant polarisant sur la réponse d'une cellule pigmentaire (tracé supérieur) à un stimulus intense durant 20 msec. Le moment et la durée d'ouverture de l'obturateur sont représentés sur le tracé inférieur.

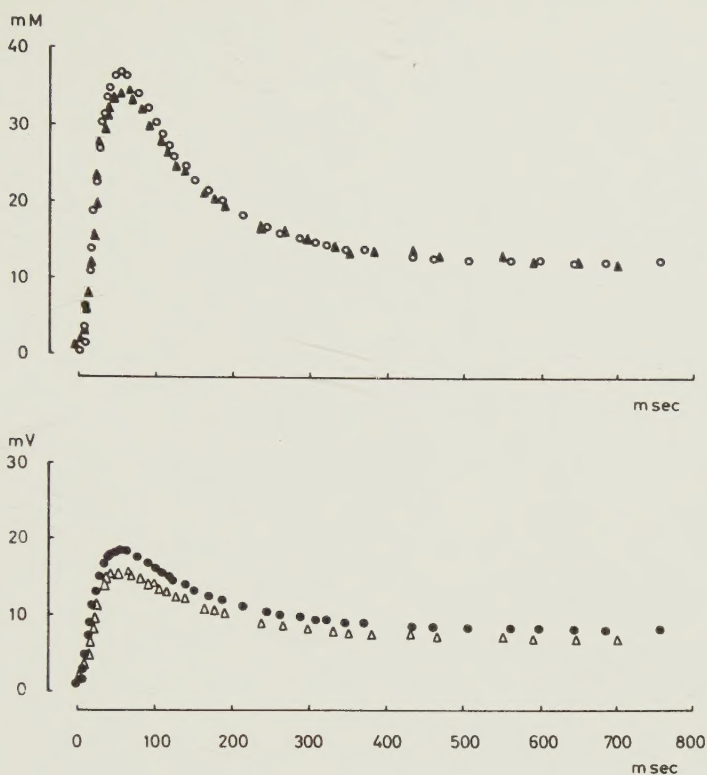


Fig. 6

Effet de l'augmentation de la concentration externe de potassium sur les réponses d'une cellule pigmentaire à un stimulus intense et de courte durée.

- (●) : Réponse de la cellule pigmentaire enregistrée dans un milieu potassique normal (3 mM).
- (Δ) : Réponse de la même cellule à un stimulus identique mais enregistrée dans un milieu riche en potassium (30 mM).
- (○) : Valeurs calculées pour une réponse en milieu potassique normal.
- (▲) : Valeurs calculées pour une réponse dans un milieu riche en potassium.

